IDENTIFICATION OF NEW DENGUE-2 VIRUS RECEPTOR PROTEINS ON LIVER CELLS

SUPRANEE UPANAN

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
(MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2006

ISBN 974-04-7699-6
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การจำแนกโปรตีนตอบรับชนิดใหม่ต่อไวรัสเด็งกี่สายพันธุ์ที่ ๒ บนผิวเซลล์เพาะเลี้ยงจากตับ (IDENTIFICATION OF NEW DENGUE-2 VIRUS RECEPTOR PROTEINS ON LIVER CELLS)

สุปราณี อุปนันท์ 4737254 MBMG/M
วท.ม. (อณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: DUNCAN R. SMITH, Ph.D., ALBERT J. KETTERMAN, Ph.D., กนกพร ไตรวิทยากร, Ph.D.

บทคัดย่อ

ไวรัสเด็งกี่ ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคไข้เลือดออกสามารถบุกรุกเซลล์เจ้าบ้านโดยการจับตัวตอบรับบนผิวเซลล์เจ้าบ้าน โดยเฉพาะอย่างยิ่งเซลล์ตับซึ่งเป็นหนึ่งในเป้าหมายหลักในการบุกรุกของไวรัส จากการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่า มีโปรตีนจำนวนมากที่มีส่วนร่วมในการเป็นตัวตอบรับต่อไวรัสเด็งกี่ รวมทั้ง โปรตีน 37/67-kDa high-affinity laminin receptor สำหรับไวรัสเด็งกี่สายพันธุ์ที่ ๑ และ GRP78 สำหรับไวรัสเด็งกี่สายพันธุ์ที่ ๒ แต่การจำแนกตัวตอบรับที่จำเพาะต่อไวรัสเด็งกี่บนผิวเซลล์เจ้าบ้านยังไม่เป็นที่แน่ชัด โดยเฉพาะอย่างยิ่ง GRP78 ซึ่งยังไม่มีการยืนยันว่าเป็นตัวตอบรับหลักสำหรับไวรัสสายพันธุ์ที่ ๒ ดังนั้น งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อจำแนกโมเลกุลของโปรตีนตอบรับต่อไวรัสเด็งกี่สายพันธุ์ที่ ๒ บนผิวเซลล์เพาะเลี้ยงจากตับ คือ เซลล์ HepG2 โดยวิธี affinity chromatography โดยใช้ DEN-2-bound Sepharose 4B column ภายใต้สภาวะที่ไม่ทำให้โปรตีนเสียสภาพ

ผลการศึกษาพบว่า DEN-2-bound Sepharose 4B affinity chromatography สามารถจำแนกโปรตีนที่จับกับไวรัสเด็งกี่สายพันธุ์ที่ ๒ และจากการยืนยันผลโดยวิธี VOPBA พบว่า โปรตีนที่มีขนาด ๖๕, ๙๘ และ ๑๙๕ kDa มีความจำเพาะต่อการจับกับไวรัสเด็งกี่สายพันธุ์ที่ ๒ บนผิวเซลล์ HepG2 ดังนั้น โปรตีนเหล่านี้อาจทำหน้าที่อยู่ในกลุ่มโปรตีนตัวตอบรับบนผิวเซลล์ นอกจากนี้แล้วผลการศึกษาโดยวิธี western blot ยังพบว่า HSP70 เป็นโปรตีนที่จับอย่างไม่จำเพาะต่อไวรัสเด็งกี่สายพันธุ์ที่ ๒ ส่วน GRP78 ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป อย่างไรก็ตาม ทั้ง GRP78 และ HSP70 น่าจะอยู่ในกลุ่มโปรตีนของตัวตอบรับซึ่งมีผลต่อการจับและการบุกรุกของไวรัสเด็งกี่ในเซลล์ HepG2 การศึกษาครั้งนี้ยังแสดงให้เห็นว่าไวรัสเด็งกี่น่าจะใช้โมเลกุลหลายชนิดบนผิวเซลล์เจ้าบ้านสำหรับการจับและการบุกรุกเข้าสู่เซลล์

จากผลการศึกษาวิจัยครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่าควรมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยใช้เทคนิค large-scale affinity chromatography, mass spectrometry รวมถึงการศึกษาด้านบทบาทหน้าที่ของโปรตีนเหล่านี้เพื่อจำแนกโปรตีนตอบรับบนเซลล์ตับต่อไวรัสเด็งกี่สายพันธุ์ที่ ๒ ต่อไป

114 หน้า ISBN 974-04-7699-6

IDENTIFICATION OF NEW DENGUE-2 VIRUS RECEPTOR PROTEINS ON LIVER CELLS

SUPRANEE UPANAN 4737254 MBMG/M

M.Sc. (MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)

THESIS ADVISORS: DUNCAN R. SMITH, Ph.D., ALBERT J. KETTERMAN, Ph.D., KANOKPORN TRIWITAYAKORN, Ph.D.

ABSTRACT

The dengue viruses cause dengue fever, dengue hemorrhagic fever, and dengue shock syndrome. In dengue virus infection, the dengue virus infects susceptible cells by binding to receptor(s) located on the host cell surface. One of the major target organs of dengue virus infection is the liver. Although a number of proteins have been implicated as dengue virus receptors, including the 37/67-kDa high-affinity laminin receptor for dengue virus serotype 1 and GRP78 for dengue virus serotype 2, identification of the dengue virus host cell receptor remains unclear. This is especially so since GRP78 does not seem to be the major receptor protein for serotype 2. This study aimed to identify receptor protein molecules for dengue virus serotype 2 on human hepatocyte (HepG2) cells, using affinity chromatography with a DEN-2-bound Sepharose 4B column under nondenaturing conditions.

Results revealed that the DEN-2-bound Sepharose 4B affinity chromatography could successfully identify DEN-2-binding proteins, and the specificity of DEN-2 binding proteins was corroborated by VOPBA. The 65, 98, and 195 kDa are candidate proteins that are specific DEN-2 binding proteins on HepG2 cell surface, and may serve as receptor protein molecules in the receptor complexes. From western blot analysis, HSP70 is shown to be a non-specific DEN-2 binding protein; however, the results in regard to GRP78 were inconclusive. Therefore, GRP78 should be studied further. GRP78 and HSP70 probably form complexes with the candidate proteins in the receptor complex involved in dengue virus binding and infection in HepG2 cells. In addition, this study demonstrated that dengue viruses probably utilize the multiple molecules on the host cell surface for binding and internalization.

These findings suggest that further studies using large-scale affinity chromatography, mass spectrometry analysis, and functional studies to identify dengue virus serotype 2 receptor proteins on liver cells need to be undertaken.

KEY WORDS : DENGUE / LIVER / RECEPTOR / VOPBA / AFFINITY CHROMATOGRAPHY

114 P. ISBN 974-04-7699-6